

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/082027 A1(51) 国際特許分類:
C12N 1/14, A61K 35/74, A61P 1/02

A23L 1/28,

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/03177

(22) 国際出願日: 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): フレン
テ株式会社 (FRENTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒175-0094
東京都板橋区成増5丁目9番7号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 古賀 泰裕
(KOGA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒259-1143 神奈川県伊勢
原市下糟屋2254-10 Kanagawa (JP).(74) 代理人: 多田 公子, 外 (TADA, Kimiko et al.); 〒162-
0041 東京都新宿区早稲田鶴巻町519 石垣ビル2F
Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VITAL CELL PREPARATIONS CONTAINING LACTIC ACID BACTERIUM AS THE ACTIVE INGREDIENT AND LACTIC ACID BACTERIUM-CONTAINING FOODS

(54) 発明の名称: 乳酸菌を有効成分とする生菌製剤および乳酸菌含有食品

(57) Abstract: Vital cell preparations or lactic acid bacterium-containing foods containing a lactic acid bacterium *Lactobacillus salivarius* as the active ingredient. These preparations and foods make it possible to prevent the occurrence, recurrence or recrudescence of periodontal diseases and/or caries caused by bacteria participating in periodontal diseases and/or caries and to normalize oral flora, thereby preventing mouth odor and maintaining the saliva within a physiologically normal pH range.

(57) 要約: 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウスを有効成分とする生菌製剤または乳酸菌含有食品を開示する。歯周病菌、齲蝕菌を原因菌とする歯周病および/又は齲蝕の発症または再発・再燃を防止することができるとともに、口腔内フローラを正常化することにより、口臭の発生防止さらには唾液のpHを生理的に正常に保つことができる生菌製剤および乳酸菌含有食品が提供される。

WO 03/082027 A1

明 細 書

乳酸菌を有効成分とする生菌製剤および乳酸菌含有食品

5 技術分野

本発明は、乳酸菌を有効成分とする、歯肉炎、歯周炎、歯周病、齲蝕および口臭の防止又は治療を目的とするトータルオーラルケア用医薬品（生菌製剤）又は乳酸菌含有食品及びその使用に関する。

10 背景技術

日本国厚生省の調査によると、歯周病に罹患している患者数は、1975年の調査では国民の18.2%であったものが、1993年には68.1%、1999年には72.9%に上昇し、その後も増加の一途を辿っており、推定患者数は9,000万人にも及ぶということが報告され、医療経済学的にも歯科領域に多くの支出負担を強いられているのが現状である。

そのため、当局はすでに1988年に国をあげて歯周病予防に取り組む事を決定し、いわゆる「8020運動」の発展と推進に当たってきた。

しかしながら、現在、なお患者数の減少はみられず、画期的予防法及び治療法の開発が望まれるところである。

近年、歯周病は、単なる歯肉組織の慢性感染症という疾患に留まらず、循環器系の疾患である心筋梗塞、動脈瘤による血管の破壊などの原因となる危険性が指摘されており、さらには糖尿病、早産誘発の危険因子として注目を浴びている。歯周病の治療には、今なおもって適確な治療法はなく、歯科技術による処置、すなわち患部への殺菌剤の投与、外科的手術、経口投与による抗生物質の使用などが行われている。しかしながら、治療のための殺菌剤や抗生物質の長期連続投与は、それらの使用による新たな耐性菌を生み出すと共に、薬剤による副作用の発現など多くの難問を抱えており、必ずしも満足のいく治療方法は確立されていないのが現状である。

そこで、歯周病や齲蝕の予防や治療を目的に、殺菌剤や抗生物質の投与に代わ

る方法として、乳酸菌を用いて上述の疾患の予防あるいは治療の可能性が検討されている。

乳酸菌を用いた歯周病や齲蝕の予防および治療法としては、*Enterococcus faecium*、*Streptococcus equinus*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus salivarius* の菌体および／又は水抽出物を有効成分とする方法が特開昭61-91126号及び特公平4-52249号に開示されており、さらに WO99/07826 においては、*Lactobacillus* spp.V20 及び *Streptococcus oralis* が発現あるいは産生するグルコース転位酵素(glucosyl transferase)阻害活性や齲蝕の増殖を抑制する因子、及び過酸化水素産生を阻害する上記乳酸菌が検討されている。

一方、ヒトの口腔内には 400 種類以上の細菌が生息しており、その菌数は 100 億個にも達している。ちなみに唾液については $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml レベルの菌数が検出される。したがって、ヒト口腔内には複雑なフローラ（口腔細菌叢）が形成されており、歯周病や齲蝕などの予防および治療について単純な *in vitro* の系で得た成績でもってヒトへの有効性を外挿して論じることが非常に問題がある。またヒトへの投与を前提としてその有効性を論じるためには、生菌製剤や乳酸菌含有食品としての生菌の生残性、さらには香味、物性についても考慮する必要がある。しかしながら、上記の歯周病や齲蝕の予防および治療への乳酸菌の利用に関する文献においては、ヒトおよびモデル動物を用いた *in vivo* 系における歯周病・齲蝕の原因菌の除菌又は抑制に関するデータ、あるいは生菌製剤や乳酸菌含有食品としての生菌の生残性、香味、物性に関するデータは一切開示されていない。

ヒトへの投与を前提とした歯周病・齲蝕の予防・治療手段となる生菌製剤あるいは乳酸菌含有食品に使用される菌株としては、ヒトおよびモデル動物を用いた試験において、口腔内病原菌である歯周病・齲蝕の原因菌を明らかに除菌又は抑制できる乳酸菌株が選定されるべきであり、また生菌製剤又は乳酸菌含有食品として使用した際には、該乳酸菌株の生残性が高いことが必須条件であり、香味、物性にも優れていることが好ましい。

発明の開示

上記のような歯周病や齲蝕の予防および治療への乳酸菌の利用に関する従来の

技術に鑑み、本発明の目的は、歯周病菌、齲蝕菌を原因菌とする歯周病および／又は齲蝕の発症又は再発・再燃を防止することができる乳酸菌株を提供することである。本発明の別の目的は上記のような乳酸菌株を含む生菌製剤および乳酸菌含有食品を提供することである。

5 上記のような菌株としては、ヒトおよびモデル動物を用いた試験において、口腔内病原菌である歯周病・齲蝕の原因菌を除菌又は抑制でき、さらには口腔内フローラを正常化することにより、口臭の発生を防止し、唾液の pH を生理的に正常に保つなどの性質が臨床的に有効性が実証された菌株を選定することが最も重要である。

10 本発明者は、上記のような観点からラクトバチルス属に属する各種乳酸菌を探索し、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) が上記の特性を有していることを見出し、本発明を完成した。

したがって本発明は、乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウスを有効成分として含む生菌製剤または乳酸菌含有食品を提供する。本発明の生菌製剤または乳酸菌含有食品は、口腔内フローラの正常化、歯肉炎、歯周炎および歯周病の発生防
15 又は治療、齲蝕の発生予防又は治療、口臭の発生予防および口臭の除去などに用いることができる。

さらに本発明は、ラクトバチルス・サリバリウスの特に好ましい菌株としてラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974)、並びにそれらの
20 菌体および乾燥菌体を提供する。上記の本発明の生菌製剤および乳酸菌含有食品は、特に好ましくは、ラクトバチルス・サリバリウスとしてラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) を含む。

また本発明は、ラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) の生菌製剤又は乳酸菌含有食品の製造における乳酸菌ラクトバチルス サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) の使用、及び乳酸菌ラクトバチルス サリ
25 バリウス TI 2711 (FERM BP-7974) 株及び該菌株とは作用機序の異なる活性成分を含む組成物を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、*L. salivarius* TI 2711 株のマウス口腔内 *P. gingivalis* JCM 8525 株に対する抑制効果 (*in vivo*) を示すグラフである。

図 2 は、*L. salivarius* TI 2711 株のマウス口腔内 *S. mutans* MT 8148 株に対する抑制効果 (*in vivo*) を示すグラフである。

5 図 3 は、ヒト口腔内総菌数の変化を示すグラフである。

図 4 は、ヒト口腔内歯周病菌 (BPAR) 菌数の変化を示すグラフである。

図 5 は、ヒト口腔内ミュータンス連鎖球菌菌数の変化を示すグラフである。

図 6 は、ヒト口腔内乳酸菌菌数の変化を示すグラフである。

図 7 は、ヒト唾液の pH の変化を示すグラフである。

10 図 8 は、ヒト唾液中の不溶性グルカンの量の変化を示すグラフである。

図 9 は、ハリメーターによるヒト口臭測定の結果を示すグラフである。

図 10 は、試験例 2 における実験 1 および実験 2 のプロトコールの概要を示す図である。

図 11 は、試験例 3 における臨床試験のプロトコールの概要を示す図である。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明者は、上記本発明の目的に合致する乳酸菌株を選定するため、以下のよう手順に従い、健康人の口腔内より分離された多数の *Lactobacillus* 属の保存菌株 (30 菌株) を試験し、最適な菌株を選定した。

20 1. 通常の乳酸桿菌と比べ最も短時間に増殖する菌株を選定した(試験例 1 の①項参照)。

2. *Lactobacillus* 属の保存菌株(30 株)のそれぞれと、主要な歯周病原菌の臨床分離株である *Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia*、*Prevotella nigrescens* のそれぞれとの混合培養を行い、歯周病菌の生育を強力に阻止できる
25 菌株を選定した (その一例として *Porphyromonas gingivalis* を使用した試験例 1 の②項参照)。

3. 次に、上記 1 の *Lactobacillus* 属の保存菌株(30 株)のそれぞれと、齲蝕の主要な原因菌の臨床分離株 *Streptococcus mutans* 及び *Streptococcus sobrinus* のそれぞれとの混合培養を行い、齲蝕菌の生育を有意に阻止できる菌株を選定し

た（その一例として *Streptococcus mutans* を使用した試験例 1 の③項参照）。

4. さらに、齲蝕に対する有効性を立証するために、混合培養中における不溶性グルカン（齲蝕の主な原因物質）を定量し、不溶性グルカンの産生を有意に阻害する菌株を選定した（試験例 1 の③項参照）。

5. 次に上記 1～4 の *in vitro* 試験によって選定された *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の有効性を実証するために、さらに無菌マウスによる感染モデル試験を行った（試験例 2 参照）。その概要は以下の通りである。

1) 歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis* を無菌マウスの口腔内に接種し、定着させた後に、*Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を経口投与し、

10 *Porphyromonas gingivalis* の菌数を測定して、生育が有意に阻止されたことを実証した（実験 1 参照）。

2) 齲蝕菌の *Streptococcus mutans* を無菌マウスに接種し、定着させた後に *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を経口投与し、*Streptococcus mutans* の菌数を測定して、生育が有意に阻止されたことを実証した（実験 2 参照）。

15 6. 臨床試験として、本人の同意を得た健常人ボランティア（n=57）を募り、口腔内の唾液を採集し、総菌数、歯周病菌（BPAR=黒色色素を呈するグラム陰性、嫌気性桿菌のコロニー）及び齲蝕菌である *Streptococcus mutans* 及び有用菌である乳酸桿菌を分別して菌数を測定し、さらに唾液の pH および唾液中の不溶性グルカンの量を測定し、さらにハリメーターを用いて口腔内の口臭測定を行った。

20 その後、*Lactobacillus salivarius* TI 2711 の錠剤（錠菓）を、服用期間を 8 週間として上記ボランティアに服用させ、服用後 4 週目及び最終の 8 週目に上記項目すべてを測定すると共に、問診による服用後の有効性又は副作用などの調査を行った。すべての項目について統計学的処理（Wilcoxon 法）を行った結果、いずれの項目についても服用前後について客観的に有意差が得られ、さらに問診の結果と合わせて総合評価を行ったところ、その有効性を臨床学的にも明確に証明す

25 ることができた（試験例 3 参照）。

上記本発明の目的に合致した菌株として上記 1～4 で選定した *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の細菌学的性状は以下の通りである。

A：形態学的性状

細胞形態：桿菌

細胞の大きさ：0.6～0.9×1.7～5.2 μm

運動性：なし

胞子の有無：なし

5 グラム染色性：陽性

B：生理学的性状（陽性：＋、陰性：－）

ガス産生：－

カタラーゼ：－

ゼラチン液化能：－

10 酸素に対する挙動：通性嫌気性

インドールの生成：－

硝酸塩還元能：－

硫化水素の生成：－

生成した乳酸の光学活性体：L体

15 C：糖の資化性（資化性陽性：＋、資化性陰性：－）

アラビノース：－

アミグダリン：－

セロビオース：－

エスクリン：－

20 ガラクトース：＋

グルコース：＋

フラクトース：＋

グルコン酸：－

ラクトース：＋

25 マルトース：＋

マンニトール：＋

マンノース：＋

メリビオース：＋

ラフィノース：＋

メレチトース：－
ラムノース：＋
リボース：－
ソルビトール：＋
スクロース：＋
キシロース：－
サリシン：－
トレハロース：＋

- 10 以上の細菌学的性質に基づき、バーギーズ・マニユアル・オブ・システマティックス・バクテリオロジー、2 巻、(1986) および腸内菌の世界、光岡知足、叢分社、(1980) の分類規準に従い、上記 1 ～ 4 で選定した本発明の菌株を *Lactobacillus salivarius* と同定したものであり、該菌株を *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株と命名した。本菌株は平成 14 年 3 月 26 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に寄託され、受託番号 FERM BP-7974 を付与されている。

- 20 本発明の乳酸菌株 *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株は、ヒトなどの宿主に経口摂取させることにより、歯周病菌や齲蝕菌の歯肉組織および歯周ポケット、歯部への付着および増殖を抑制あるいは阻止し、口腔内に存在する病原菌を抑制あるいは排除することができる。これにより、国民病とも云うべき、歯周病や齲蝕の予防あるいは治療に極めて有効な手段を提供するものである。このような宿主と口腔内微生物間の相互作用は広く自然界において観察されており、宿主と微生物との係わりの中で共生、寄生あるいは拮抗現象として理解されている。

- 25 次に本発明の乳酸菌株（*Lactobacillus salivarius* TI 2711 株）の用途について述べる。

本発明の乳酸菌株（*Lactobacillus salivarius* TI 2711 株）を有効成分としてそのままあるいは適当な添加剤とともに単剤として投与することも可能であり、また他の活性成分、例えば該菌株とは作用機序の異なる他のオーラルケア医薬品な

どと同時に投与あるいは合剤として投与してもよい。その投与形態としては、例えば散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤などの形態が好ましく、経口的に安全に投与することができる。本発明の乳酸菌株をこれらの投与形態に使用する場合は、本発明の乳酸菌株の乾燥菌体（生菌）を使用して製剤にすることが好ましい。本発明の乳酸菌株の乾燥菌体（生菌）は常法により得ることができ、例えば、本発明の乳酸菌株を純粋培養し、遠心分離などの方法により集菌後、適切な安定剤を加えて凍結乾燥することにより得られる。

- 5 また上記の各種製剤は常法に従って製造することができ、主薬である本発明の乳酸菌株とともに、賦形剤、結合剤、崩壊剤、コーティング剤、潤滑剤、安定剤、
10 矯味矯臭剤、溶解補助剤、滑沢剤、懸濁剤、希釈剤などの医薬品の製剤技術分野において通常使用される既知の医薬品添加物を用いて製造することができる。

上記各種製剤の投与量は、対象疾患の種類、程度などによっても異なるが、例えば本発明の乳酸菌株の乾燥菌体として1日1 mg~2,000 mg 程度を症状に応じて1日1回又は数回に分けて投与することができる。

- 15 また、本発明の乳酸菌株は錠菓、ガム、飴類などの菓子類、キムチなどのつけもの類をはじめ広く一般の食品に添加して使用することもでき、乳酸菌含有食品を提供することができる。本発明の乳酸菌株を食品に使用する場合においても、本発明の乳酸菌株の乾燥菌体（生菌）を使用することが好ましく、それを任意に食品として許容される添加物とともに広く一般の食品に添加することができる。

- 20 さらに本発明の乳酸菌株は、ヨーグルトなどの醗酵食品の形態で摂取させることも可能である。このような発酵食品は、例えば、牛乳や羊乳などの醗酵原料に、ヨーグルト製造上のスターター菌である *Lactobacillus bulgaricus*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus helveticus*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus lactis* などの酪農乳酸菌とともに本発明の乳酸菌株を接種し、混合
25 培養するか、あるいは各々を醗酵原料中で単独培養後に混合することによって製造することができる。

本発明者は、本発明の乳酸菌株の効果をさらに高めるために、本発明の乳酸菌株とともに相加又は相乗効果を示す物質を見出すため、齧蝕を指標として本発明の乳酸菌株とともにオリゴ糖および糖アルコール類を含む組成物の効果を調べた。

その結果、糖アルコールのエリスリトールを本発明の乳酸菌株とともに使用した場合、不溶性グルカンの産生の抑制においてそれぞれ単独の抗齲蝕効果に対して相乗的な効果を示すことが見出された（試験例 4 参照）。

5 糖アルコール類（キシリトール、マルチトール、ソルビトール、エリスリトースなど）およびオリゴ糖（フラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、kestose、ラフィノースなど）は齲蝕に対し有効であることは一般に知られているが、これらの糖アルコールおよびオリゴ糖と乳酸菌株との相乗効果または相加効果については、乳酸菌株の選定によって大きく異なるところである。

10 これらの有用な糖アルコール及びオリゴ糖は単独又は混合して本発明の生菌製剤または乳酸菌含有食品に使用することができる。これらの糖アルコール及びオリゴ糖は賦形剤又は甘味剤としての機能を果たすこともできる。これらの糖アルコール及びオリゴ糖の種類、配合割合などは特に制限されず、任意の糖アルコールまたはオリゴ糖を任意の比率で使用することができる。例えば錠菓の場合、常用される打錠技術を用いて、錠剤組成、打錠圧などの条件、錠菓の硬度などを適
15 当に選択することにより、任意の糖アルコールまたはオリゴ糖を任意の比率で含む製品を容易に製造することができる。

以下に、実施例および試験例を参照して本発明をさらに詳細に説明するが、これらにより本発明が限定されるものではない。

20 試験例 1：口腔内病原細菌の抑制に適する乳酸桿菌の菌株（*Lactobacillus* 属）の選択

① 増殖性に関する試験

MRS broth(Difco)培地に、表 1 に示した *Lactobacillus* 属に属する乳酸菌 30 株をそれぞれ 1×10^7 CFU/ml 接種し、37°C で 6 時間、好気条件下に培養後、寒
25 天平板法にて生菌数を測定した。

すなわち、各菌株の上記培養 6 時間目の培養液 1ml を嫌気性希釈液（ KH_2PO_4 4.5g/l、 Na_2HPO_4 6.0g/l、システイン塩酸塩 0.5g/l、寒天 0.5g/l、Tween 80 0.5g/l）にて段階希釈を行い、希釈液の 0.1ml を MRS 寒天培地（MRS broth に寒天 1.5% を添加した寒天平板）にまき広げ、37°C で 48 時間、嫌気条件下に培養した後、コ

ロニー数を計測し、希釈倍数を乗じて生菌数を求めた。結果を表1に示す。

② 歯周病原菌の主要病原菌である *Porphyromonas gingivalis* JCM 8525 株に対する抑制作用の試験

- GAM ブイヨン（日水）に 0.7%のグルコースを添加した液体培地 10ml に
- 5 *Porphyromonas gingivalis* JCM 8525 株（菌数： 1×10^6 CFU/ml）を単独（コントロール）あるいは表1に示した 30 株の乳酸桿菌のそれぞれ（菌数： 1×10^6 CFU/ml）とともに混合接種した。嫌気培養条件下にて 37℃で 12 時間培養後、培養液中の *Porphyromonas gingivalis* の生菌数を寒天平板法により測定し、
- 10 *Porphyromonas gingivalis* 単独で培養した場合の *Porphyromonas gingivalis* の生菌数（コントロール、100%）に対する *Lactobacillus* 属菌との混合培養時の *Porphyromonas gingivalis* の生菌数の割合を求めた。

- 寒天平板法による *Porphyromonas gingivalis* の菌数測定には EG 寒天培地（日水）にゲンタマイシン $10 \mu\text{g/ml}$ を添加した EG-GM 培地を選択培地として用いて *Porphyromonas gingivalis* のみを生育させ、菌数を測定した。すなわち、
- 15 *Porphyromonas gingivalis* 単独あるいは、各乳酸桿菌株（30 株）のそれぞれとの混合培養を行った上記の培養液を、各々 1ml を採取し前記嫌気性希釈液にて段階希釈し、その 0.1ml を上記 EG-GM 寒天平板にコンラージ棒にてまき広げ、37℃で 48~72 時間嫌気培養し、得られたコロニー数を計測後、希釈倍数を乗じて生菌数を求めた。

- 20 *Porphyromonas gingivalis* 単独で培養した場合の *Porphyromonas gingivalis* の生菌数（コントロール、100%）に対する *Lactobacillus* 属菌との混合培養時の *Porphyromonas gingivalis* の生菌数の割合を *Porphyromonas gingivalis* の生存率とし、下記式に従って計算した。結果を *P. gingivalis* の生存率(%)として表1に示す。したがって、*Lactobacillus* 属菌の *P. gingivalis* に対する阻害率(%)は、
- 25 Control (100%)から *P. gingivalis* の生存率(%)を減じて得られる値(%)により表わされることになる。

$$\text{生存率} = \frac{\text{混合培養液中の } P. \text{ gingivalis の菌数}}{P. \text{ gingivalis 単独培養の菌数}} \times 100$$

③ 齲蝕の主要な病原菌 *Streptococcus mutans* MT 8148 株に対する抑制および不溶性グルカンの産生抑制の試験

GAM ブイヨン（日水）にグルコース 0.7%、スクロース 3%を添加した液体培地 5ml を遠心スピッツ管に入れ、さらに *Streptococcus mutans* MT 8148 株（菌数 1×10^6 CFU/ml）を単独（コントロール）あるいは表 1 に示した 30 株の乳酸桿菌（菌数： 1×10^6 CFU/ml）のそれぞれとともに混合接種した。好气的条件下にて 37℃で 24 時間培養後、培養液中の *Streptococcus mutans* の生菌数を寒天平板法により測定し、*Streptococcus mutans* 単独で培養した場合の *Streptococcus mutans* の生菌数（コントロール、100%）に対する *Lactobacillus* 属菌との混合培養時の *Streptococcus mutans* の生菌数の割合を求めた。

寒天平板法による *Streptococcus mutans* の菌数測定には、TCYSB 寒天培地（トリプチケースソイアガー（BBL）40g/l、シスチン 0.3g/l、酵母エキス 5g/l、スクロース 200g/l、寒天 5 g/l、バシトラシン 10 U/ml）を選択培地として用いることにより *Streptococcus mutans* のみを生育させ、菌数を測定した。すなわち上記各培養液から 1ml を採取して上記嫌気性希釈液にて段階希釈し、その 0.1ml を上記選択培地プレートに広げ、37℃で 72 時間培養した。プレート上に生じたコロニーを計測し希釈倍率を乗じて生菌数を求めた。

Streptococcus mutans 単独で培養した場合の *Streptococcus mutans* の生菌数（コントロール、100%）に対する *Lactobacillus* 属菌との混合培養時の *Streptococcus mutans* の生菌数の割合を *Streptococcus mutans* の生存率(%)とし、上記②と同様に計算した。結果を *Streptococcus mutans* の生存率(%)として表 1 に示す。したがって、*Lactobacillus* 属菌の *S. mutans* に対する阻害率(%)は Control (100%)から *S. mutans* の生存率(%)を減じて得られる値(%)により表わされることになる。

一方、不溶性グルカンの測定については、上記培養液を入れた各スピッツ管に付着した不溶性グルカンをスパテルで良くそぎ落とし、3,000rpm で 15 分間遠心分離して沈殿を集め、PBS(Phosphate Buffer Solution)で 2 回洗浄後、5ml の PBS を加えて測定検体とした。なお、不溶性グルカンはフェノール硫酸法により定量

した（糖、蛋白質、糖鎖研究法 追補版高橋禮子著 生化学実験法 23）。結果を *Streptococcus mutans* を単独で培養した場合に測定された不溶性グルカンの量に対する各 *Lactobacillus* 属菌と混合培養した場合に測定された不溶性グルカンの量の比（不溶性グルカンの生成率、%）として表 1 に示す。したがって、

- 5 *Lactobacillus* 属菌の *S. mutans* に対する不溶性グルカン産生の阻害率(%)は Control (100%)から *S. mutans*により産生された不溶性グルカンの生成率(%)を減じて得られる値(%)により表わされることになる。

表 1 : *Lactobacillus* 属各種乳酸菌株の増殖性、*P.gingivalis* JCM 8525 株と *S. mutans* MT 8148 株に対する抑制効果 (*in vitro*) および不溶性グルカンの生成抑制効果

培養条件		好氣的	嫌氣的	好氣的	好氣的
<i>Lactobacillus</i> 属		増殖性 (6 時間目の 生菌数/ml)	<i>P.gingivalis</i> の 生存率 (%)	<i>S.mutans</i> の 生存率 (%)	不溶性グルカンの 生成率(%)
(1) <i>Lactobacillus acidophilus</i>	A	5.0×10^7	101	72	60
(2) <i>L. acidophilus</i>	B	3.0×10^7	111	111	80
(3) <i>L. casei</i>	TI1001	2.0×10^7	106	106	100
(4) <i>L. casei</i>	TI1002	6.2×10^7	100	100	98
(5) <i>L. rhamnosus</i>	TI1003	7.2×10^7	111	111	69
(6) <i>L. gasseri</i>	TI1004	8.2×10^8	55	55	11
(7) <i>L. gasseri</i>	TI1005	4.6×10^8	60	60	8
(8) <i>L. gasseri</i>	TI1006	6.0×10^8	65	65	15
(9) <i>L. johnsonii</i>	TI1008	4.0×10^8	82	4	70
(10) <i>L. salivarius</i>	ATCC11741	1.8×10^9	5.2	0.9	28
(11) <i>L. salivarius</i>	ATCC11742	1.2×10^9	10	1.2	30
(12) <i>L. salivarius</i>	TI1101	2.0×10^9	5	0.5	26
(13) <i>L. salivarius</i>	TI1102	3.0×10^9	1.0	0.1	31
(14) <i>L. salivarius</i>	TI1103	2.2×10^9	5.2	2.0	28
(15) <i>L. salivarius</i>	TI1104	1.6×10^9	10.2	1.8	28
(16) <i>L. salivarius</i>	TI1109	1.8×10^9	5.0	3.0	26
(17) <i>L. salivarius</i>	TI2700	2.6×10^9	0.5	4.0	28
(18) <i>L. salivarius</i>	TI2703	2.0×10^9	4.8	2.6	26
(19) <i>L. salivarius</i>	TI2704	2.0×10^9	5.6	3.2	32
(20) <i>L. salivarius</i>	TI2705	3.0×10^9	0.1	1.0	28
(21) <i>L. salivarius</i>	TI2706	3.2×10^9	0.1	0.8	22
(22) <i>L. salivarius</i>	TI2707	2.4×10^9	0.2	2.8	30
(23) <i>L. salivarius</i>	TI2708	2.2×10^9	0.5	2.2	30
(24) <i>L. salivarius</i>	TI2709	3.0×10^9	0.05	1.0	28
(25) <i>L. salivarius</i>	TI2710	3.6×10^9	0.05	0.5	25
(26) <i>L. salivarius</i>	TI2711	4.0×10^9	0.002	0.05	20
(27) <i>L. salivarius</i>	TI2714	2.2×10^9	0.005	0.1	21
(28) <i>L. salivarius</i>	TI2715	2.1×10^9	10.1	0.1	26
(29) <i>L. salivarius</i>	TI2721	3.0×10^9	1.0	0.08	22
(30) <i>L. salivarius</i>	TI2722	3.2×10^9	2.0	0.08	24
(31) Control *			100	100	100

*) Control は *P. gingivalis* および *S. mutans* のそれぞれを単独培養して得られた

5 菌数であり、100(%)として示した。

表 1 に示した結果より、*Lactobacillus* 属 30 株のうち、最も増殖性が良く、歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* および齲蝕菌の *Streptococcus mutans* の増殖を最も強く抑制し、かつ不溶性グルカンの産生量が少ない非常にすぐれた菌株は(26)番の *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株であることが明らかとなった。

5

試験例 2 : *In vivo* における *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の無菌マウス口腔内の *Porphyromonas gingivalis* (歯周病原菌) 及び *Streptococcus mutans* (齲蝕原因菌) に対する有効性

①試験方法

10 実験 1

BALB/C 4 週令の無菌マウスを用い、Control 群(感染後非投与群、n=10)、及び歯周病原菌感染後投与群 (n=10) に分けた。感染後投与群 及び Control 群 にそれぞれ歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* JCM8525 の 1×10^9 CFU /0.5ml を連続 3 日間、合計 3 回口腔内に接種し、さらに感染成立後 1 週間
15 目に、感染後投与群に本発明の乳酸菌株である *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株 (菌数 1×10^9 CFU /0.5ml) を連続 3 日間、合計 3 回投与した。

その後、感染マウスの口腔内を嫌気希釈液を充分染み込ませた無菌綿棒でよくふきとることにより、口腔内の全唾液を 1 週目、2 週目および 4 週目にそれぞれサンプリングし、唾液中に含まれる *Porphyromonas gingivalis* の菌数を測定し
20 た。*Porphyromonas gingivalis* の菌数測定は試験例 1 の②項と同様に行った。

実験 2

BALB/C 4 週令の無菌マウスを用い、Control 群(感染後非投与群、n=10)、及び齲蝕原因菌感染後投与群 (n=10) に分けた。感染後投与群 及び Control 群 に
25 それぞれ齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* MT8148 の 1×10^9 CFU/0.5ml を連続 3 日間、合計 3 回口腔内に接種し、さらに感染成立後 1 週間目に、感染後投与群に本発明の乳酸菌株である *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株 (菌数 1×10^9 CFU /0.5ml) を連続 3 日間、合計 3 回投与した。

その後、感染マウスの口腔内を嫌気希釈液を充分染み込ませた無菌綿棒でよく

ふきとることにより、口腔内の全唾液を 1 週目、2 週目および 4 週目にそれぞれサンプリングし、唾液中に含まれる *Streptococcus mutans* の菌数を測定した。

Streptococcus mutans の菌数測定は試験例 1 の③項と同様に行った。

5 以上の *in vivo* における実験 1 及び実験 2 のプロトコールの概要を図 10 に示す。また実験 1 及び実験 2 の結果を図 1 及び図 2 に示す。

(試験結果)

図 1 に示す実験 1 の結果から明らかなように、無菌マウス (BALB/c) に本発明の乳酸菌株 *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を投与した前後で歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* の菌数を比較すると、*Porphyromonas gingivalis* の菌数は、Wilcoxon 法に基づく有意差検定における有意差 $P < 0.001$ をもって、投与後明らかに減少した。

図 2 に示す実験 2 の結果から明らかなように、無菌マウス (BALB/c) に本発明の乳酸菌株 *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を 4 週間にわたって投与し、齲蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* MT 8148 株の菌数の変動を調べたところ、投与後との菌数は、すでに第 1 週目にして $P < 0.01$ で菌数が投与前と比較して有意に減少し、第 4 週に至っても統計学的に有意に減少し続けたことが示された ($P < 0.01$)。

20 試験例 3

臨床試験のプロトコール

書面による同意を得た健常人ボランティア 57 名について、下記のプロトコールに従って臨床試験を実施した。

25 本発明の乳酸菌株 *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の凍結乾燥菌末を 1 錠当たり 140mg (菌数 1×10^8 CFU/g) 含む錠菓を調製し、1 回 5 錠、1 日 5 回、合計 25 錠を食間に各ボランティアに服用させた。2 ヶ月の服用期間にわたって連日服用させ、唾液採集、口臭測定及び医師による問診を行った。

第 1 回検査として服用前に、唾液の採集、口臭測定 (ハリメーター C 21、インタースキヤン社製、米国) 及び問診を行い、同様に第 2 回の検査を服用後 4 週

目に実施し、第3回の最終検査を服用後8週目に実施した。

図11に本試験例の臨床試験のプロトコールの概要を示す。

㊦唾液中の菌数測定法

- 5 採集した健常人ボランティア(n=57)の唾液 100 μ l を滅菌嫌気性希釈液(試験例1の①項参照) 900 μ l に加えたものを原液($\times 1$ 倍液)とし、さらに段階希釈をして $\times 3$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 倍の希釈液を調製して0.1mlを計り、あらかじめ準備した下記に示す選択培地の寒天平板培地に塗布後コンラージ棒でまき広げた。その後、37℃で、72時間嫌気培養を行い、出現したコロニー数を計測して総菌数、
- 10 Lactobacilli 菌数、歯周病菌菌数及び齲蝕菌群菌数を求めた。その後、コロニーを1白金耳採取してグラム染色を行い、顕微鏡下で確認した。
- 選択培地
- ・ 総菌数：BL 寒天培地及び EG 寒天培地を使用
 - ・ Lactobacilli：変法 LBS 寒天培地
 - 15 ・ 歯周病菌 (BPAR=嫌気性グラム陰性黒色桿菌)：EG-GM 寒天培地、BL 寒天培地
 - ・ 齲蝕菌群 (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*)：TCYSB 寒天培地
- ㊦不溶性グルカンの定量：フェノールー硫酸法による
- ㊦口臭測定：ハリメーターC21 (インタースキャン社製、米国) 使用、測定温度
- 20 20℃
- ㊦pH の測定：小型 pH メーター (堀場製作所製)

(試験結果)

- ㊦ 口腔内の総菌数について
- 25 得られた総菌数の結果を図3に示す。図3に示した通り、錠剤服用前及び4週間服用後におけるヒト口腔内の総菌数には全く有意差が認められなかった。
- ㊦ 口腔内歯周病菌 (BPAR=黒色色素を産生するグラム陰性、嫌気性桿菌) の変動について
- 得られた口腔内歯周病菌菌数の結果を図4に示す。図4に示す通り、服用前に

は検出限界以下の菌数を有するものが 8 名存在し、その平均値は $10^{6.6 \pm 1.3}$ CFU/唾液総量であったものが、服用後 4 週間には、検出限界以下の菌数を有するものが 30 名に大幅に増加し、その平均値は $10^{5.3 \pm 1.6}$ CFU/唾液総量 ($P < 0.0001$) であった。したがって *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の服用により、病原菌である歯周病菌が除菌及び抑制されたことが示された。

③ 口腔内齲蝕菌（グラム陽性のミュータンス連鎖球菌）の変動について

得られた齲蝕菌群菌数の結果を図 5 に示す。図 5 に示すように、服用前後でミュータンス連鎖球菌の唾液中の菌数には有意差は認められなかった。

④ 口腔内乳酸菌の変動について

得られた口腔内乳酸菌菌数の結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、口腔内の乳酸桿菌の菌数についても、服用前後で有意差は認められなかった。

⑤ 唾液 pH の変動について

唾液 pH の変動の測定の結果を図 7 に示す。服用前の 57 名については pH のバラツキ（pH の変動幅）も大きく、その平均値は $\text{pH} 7.0 \pm 0.7$ を示したが、服用 4 週間後には、pH のバラツキが小さくなり、平均値は $\text{pH} 7.3 \pm 0.2$ を示し、血液の pH とほぼ同じ値を示した。すなわち、唾液の pH が正常に保持されていることを示している。この現象は 8 週間後にも見られ、pH が正常に維持されており、かつバラツキも非常に少ない。これらの結果は、ヒトに乳酸菌を投与すると乳酸の産生が促進され、齲蝕を助長するのではないかという疑問を根底から覆すデータであり、その臨床的意義は極めて重要な結果である。

⑥ 唾液中の不溶性グルカンの産生量の変動について

唾液中の不溶性グルカンの産生量の測定の結果を図 8 に示す。図 8 に示すように、服用前における唾液中の不溶性グルカンの量は、平均値 $9.9 \pm 6.0 \text{mg}$ /唾液総量であったものが、服用後 4 週目には、平均値 $7.6 \pm 5.8 \text{mg}$ /唾液総量 ($P < 0.05$) となり、統計学的に有意差が認められた。さらに 8 週目においては、平均値 $4.2 \pm 2.2 \text{mg}$ /唾液総量 ($P < 0.001$) となり、*Lactobacillus salivarius* TI 2711 株服用について Dose Response Correlation が認められた。これは本臨床試験により示される本発明乳酸菌株の有効性の科学的根拠を構成する証拠の一部である。すなわち、本発明の乳酸菌株は、歯垢（Dental plaque）の主要原因物質である不溶

性グルカンの産生を食い止め、嫌気性の歯周病菌や齲蝕菌の生息場所を元から断つことができ、齲蝕や歯周病などの慢性感染症の進展・再発・再燃を抑え込む手段となり得ることが判明した。さらに、*Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を長期に服用すれば、前述のように唾液の pH が正常になり、かつ歯垢が形成されにくいため、口腔内細菌による歯垢内部での酸の産生が抑制され、齲蝕や歯周病の予防と軽度の症例の治療に役立つことが強く示唆された。

⑦ ハリメータによる口臭測定の結果について

口臭測定として、健常人ボランティアの呼気中の揮発性硫化化合物量をハリメータを使用して測定した。口臭発生の主要な原因の 1 つとして、歯周病菌による蛋白質の分解が挙げられる。すなわち、歯周病菌は蛋白質分解酵素 (protease) の活性が著しく高いので、本菌の栄養源の 1 つである口腔内の食べカスなどの蛋白質を容易に分解し、 H_2S や CH_3SH その他の Thiol 類、Sulfide 類などの揮発性硫化化合物(VSC=Volatile Sulfurated Compound)である口臭原因物質を発生させるものである。

本発明の乳酸菌株を含む錠菓服用前の健常人ボランティア 57 名の呼気中の揮発性硫化化合物量をハリメータを使用して室温 (20℃) で測定し、RU (Response Unit、ppb=parts per billion) 値が 65ppb 以上のボランティア 20 名を対象として服用後の追跡測定を行った。その結果を図 9 に示す。

図 9 に示すように、この 20 名の口臭の RU 値は服用前に 164 ± 96 ppb (平均 \pm 標準誤差) であったものが服用後 4 週目には 94 ± 21 ppb に低下し、統計学的にも極めて有意な差 ($P < 0.005$) が認められた。

さらに、8 週間目の測定においては、RU 値は 90 ± 21 ppb に低下し、65ppb 以下の口臭を全く感じない正常者が 13 名存在した。($P < 0.001$)。

すなわち、服用前の口臭のあるボランティアの数を 100%としたとき、その数は 4 週目では 52%に減少し、さらに 8 週目では 38%に減少した。

これらの結果は、ほぼ Dose Response Correlation を示しており、本発明の乳酸菌株の長期服用により口臭除去が可能であることを示している。

また、本発明の乳酸菌株である *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株による歯周病菌の抑制事実と口臭発生を抑える事実はよく相関していた。

なお、医師による 57 名の問診の結果、全例において腹部症状の発生は認められなかった。

試験例 4

- 5 各種オリゴ糖、糖アルコール類の添加および *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株接種による *Streptococcus mutans* の不溶性グルカン産生に対する抑制効果 (*in vitro*)

試験方法

- 10 基礎培地として GAM プイヨン (日水) にグルコース 0.7%、スクロース 3% を含む液体培地に糖アルコールとしてキシリトール、エリスリトール、ソルビトールおよびオリゴ糖としてフラクトオリゴ糖、ケトースのそれぞれを 5% 加え、*Streptococcus mutans* MT 8148 株を 1×10^7 CFU/ml それぞれの培地に接種し、37°C で 24 時間好気培養を行った。

- 15 一方、上述の糖アルコール類及びオリゴ糖の 5% 添加培地に *Streptococcus mutans* MT 8148 株を 1×10^7 CFU/ml をそれぞれ接種後、さらに *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を 1×10^7 CFU/ml 接種して同様に 37°C で 24 時間好気培養を行った。培養終了後、両者の *Streptococcus mutans* MT 8148 株の菌数測定及び不溶性グルカンの定量 (試験例 1 に記載の方法) を行った。結果を表 2 に示す。

20 試験結果

- 25 表 2 に示した通り、糖アルコール及びオリゴ糖の中で最も不溶性グルカンの産生を阻害した物質はエリスリトールであり、エリスリトール単独では約 60% 阻害されたが、さらに *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を接種し混合培養した結果、それらの相加又は相乗効果が認められ、*Lactobacillus salivarius* 非接種の不溶性グルカンの量を 100% としたときに約 90% の阻害率を示し、良好な結果を得た。

表 2

オリゴ糖および 糖アルコール (5%添加)	<i>L.salivarius</i> 非接種		<i>L.salivarius</i> 接種	
	<i>S.mutans</i> の 生菌数 (CFU/ml)	不溶性グルカン量 (μ g/ml)	<i>S.mutans</i> の 生菌数 (CFU/ml)	不溶性グルカン量 (μ g/ml)
キシリトール	4.0×10^5	5,992	5.0×10^5	1,996
エリスリトール	1.0×10^5	4,324	1.0×10^4	962
ソルビトール	4.0×10^5	4,384	3.0×10^5	1,691
フラクトオリゴ糖	4.0×10^5	6,659	2.0×10^5	1,892
kestース	5.0×10^5	7,392	2.0×10^5	2,886
control(基礎培地)	4.0×10^5	11,160	2.0×10^5	2,394

実施例 1 : *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の乾燥菌体の調製

- 5 *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株を 0.3%炭酸カルシウムを含むブリック
ス・リバー液体培地に接種後、37℃で 18 時間静置培養を行った。培養終了後、
7,000rpm、15 分間遠心分離を行い培養液の 1/100 量の濃縮菌体を得た。

- 次いで、その濃縮菌体にグルタミン酸ソーダ 5% (重量)、可溶性デンプン 5%
(重量)、蔗糖 5% (重量) を含む分散媒と同量混合し、pH7.0%に修正後、-40℃
以下で凍結してから凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥菌末を 60 μ m シュの
10 篩上で粉末化して本発明の乳酸菌末を調製した。なお、本菌の保存安定性につい
て、乳酸菌末を室温 24℃、10 ヶ月、密封条件下 (アルミラミネート袋) に保管
しても菌数の低下は認められなかった。

実施例 2 : 医薬品生菌製剤 (錠剤) の製造

- 15 第 12 改正日本薬局方解説書製剤総則「錠剤」の規定に準拠し、実施例 1 で調
製した *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株乾燥菌末 2g (菌数、 5×10^9 CFU/g 相
当) と乳糖 (日局) 161g、澱粉 (日局) 116g、結合剤ポリビニールピロリドン K
25 (日局) 20g、滑沢剤としてステアリン酸マグネシウム (日局) 0.8g を加えて
均一に混合し、打錠機で圧縮成型して、1 錠当たり 300mg の素錠を 290g 製造した。

20

実施例 3 : 乳酸菌含有食品 (錠菓) の製造

- 第 12 改正日本薬局方解説書製剤総則「錠剤」の項を参考に、*Lactobacillus*
salivarius TI 2711 株乾燥菌末 0.7g (菌数、 5×10^9 CFU/g 相当)、エリスリトー

ル 47g、ソルビトール 47g、l-メントール 2.5g、フレーバー（ライム）1.5g 及び滑沢剤として日本国の食品添加物として指定されているショ糖脂肪酸エステル 1.3g を加えて均一に混合し、打錠機で圧縮成型し、1 錠当り 300mg の素錠を 95g 製造した。

5

実施例 4：乳酸菌含有食品（ガム）の製造

Lactobacillus salivarius TI 2711 株乾燥菌末 10g（菌数、 5×10^9 CFU/g 相当）
エリスリトール 160g、ソルビトール 160g、香料としてペパーミントオイル 20g
及びガムベース（食品添加物）150g をあらかじめ秤量しておき、ガム製造用のニ
10 ーダーを用いてガムベースをよく練混後、あらかじめ甘味剤であるエリスリトール
及びソルビトールさらに *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株乾燥菌末を均一に
混合したものを、ガムベース練混時に少量ずつ加え均一に練混し、最後にペパー
ミントオイルを加えて賦香して均一に練混した。練混終了後、ニーダーよりガム
の塊を取り出し、圧延ローラーにかけて厚さ 2mm の板ガムを作製し、2 日間、
15 恒温室にて熟成後、市販の板ガムの大きさに裁断してガムを製造した。

実施例 5：乳酸菌含有食品（醗酵乳）の製造

スターター菌 *Lactobacillus acidophilus* と *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株の
混合培養による製造

20 醗酵乳のスターター菌である *Lactobacillus acidophilus* を脱脂粉乳 23g、酵母
エキス 1.0g、アスコルビン酸 0.06g を含む還元脱脂培地に接種し、37℃で 16 時
間静置培養したものをバルクスターターとした。

一方、生乳および脱脂粉乳からなる原料混合物に実施例 1 で調製した
Lactobacillus salivarius TI 2711 株の培養液と先に調製しておいたバルクスター
25 ター培養液をそれぞれ 5%接種し、37℃で 16 時間培養を行い、醗酵乳を得た。本
発明の菌株を用いて製造した醗酵乳は風味共に美味であり嗜好性の高い製品であ
った。

産業上の利用可能性

本発明の *Lactobacillus salivarius* TI 2711 株について、*in vitro* 試験、無菌マウスを用いた *in vivo* の試験、さらには長期にわたった臨床試験 (n=57) を行った結果、いずれの試験においても口腔内フローラの正常化、歯周病菌や齲蝕菌の

5 抑制、口臭発生防止などについて有効性が立証された。

すなわち、本発明の菌株を服用又は摂取することにより口腔内フローラを正常化し、その結果として歯周病菌や齲蝕菌を抑制し、ひいては口臭発生を抑えることができ、本発明の菌株は、唾液の pH を生理的に正常に保つこと、歯肉炎、歯周炎および歯周病の発生防止又は治療、齲蝕の発生予防又は治療、口臭の発生予

10 防および口臭の除去などに用いることができる生菌製剤または乳酸菌含有食品の成分として有用である。

請求の範囲

1. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウスを有効成分とする口腔内フローラを正常化するために用いる生菌製剤または乳酸菌含有食品。

5

2. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウスを有効成分とする歯肉炎、歯周炎および歯周病の発生防止又は治療用の生菌製剤または乳酸菌含有食品。

3. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウスを有効成分とする齲蝕の発生予防又は治療用の生菌製剤又は乳酸菌含有食品。

10

4. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウスを有効成分とする口臭の発生予防および口臭の除去用の生菌製剤又は乳酸菌含有食品。

5. 乳酸菌がラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) である請求項 1～4 のいずれかに記載の生菌製剤又は乳酸菌含有食品。

15

6. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974)。

7. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) を純粋培養して得られる菌体。

20

8. 乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) の菌体を乾燥して得られる乾燥菌体。

25

9. 生菌製剤又は乳酸菌含有食品の製造における乳酸菌ラクトバチルス サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974) の使用。

10. 乳酸菌ラクトバチルス サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974)

及び該菌株とは作用機序の異なる活性成分を含む組成物。

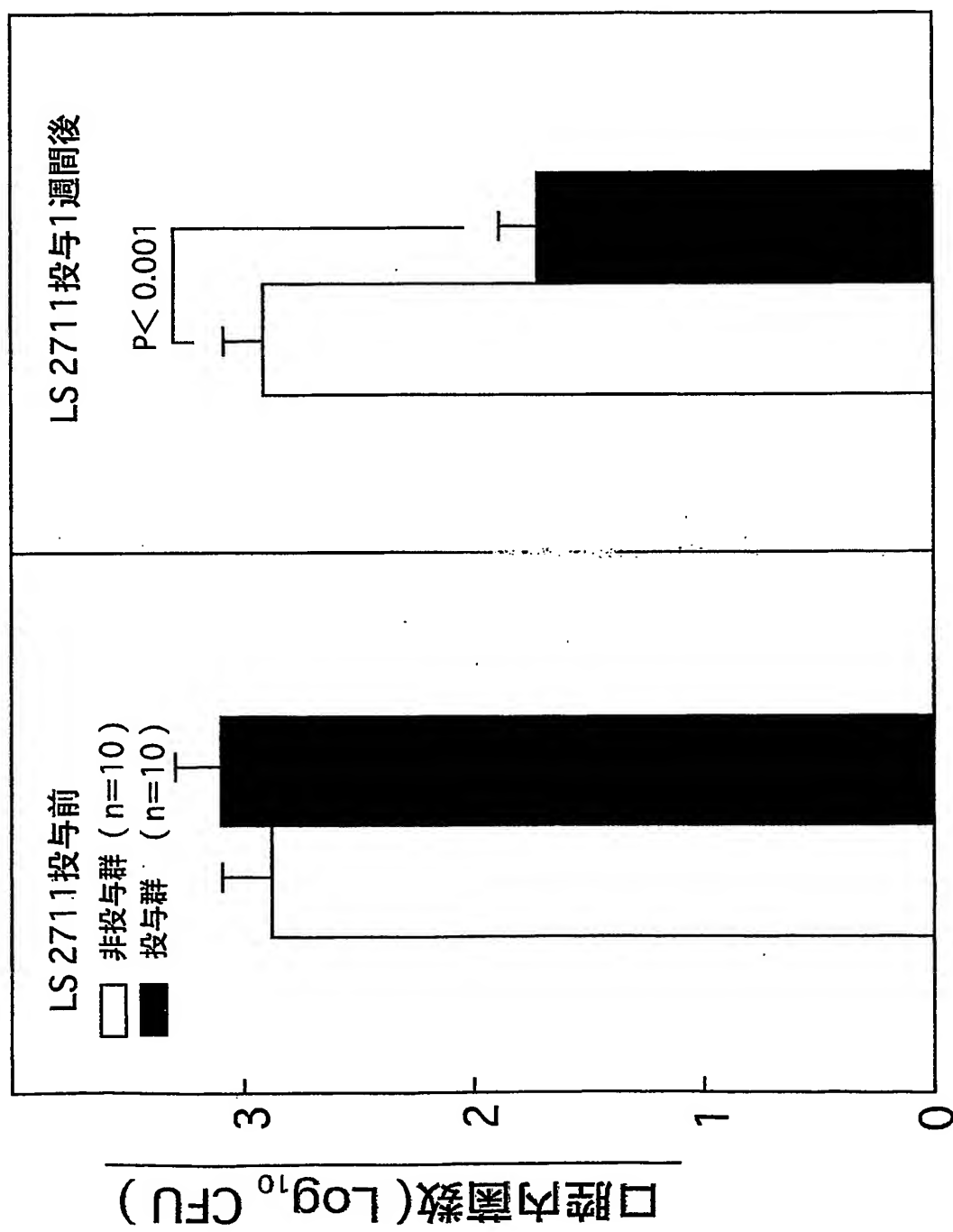
11. 乳酸菌ラクトバチルス サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974)
と、糖アルコール及びオリゴ糖から選択される物質とを含む請求項 10 に記載の

5 組成物。

12. 乳酸菌ラクトバチルス サリバリウス TI 2711 株 (FERM BP-7974)
と、エリスリトールとを含む請求項 11 に記載の組成物。

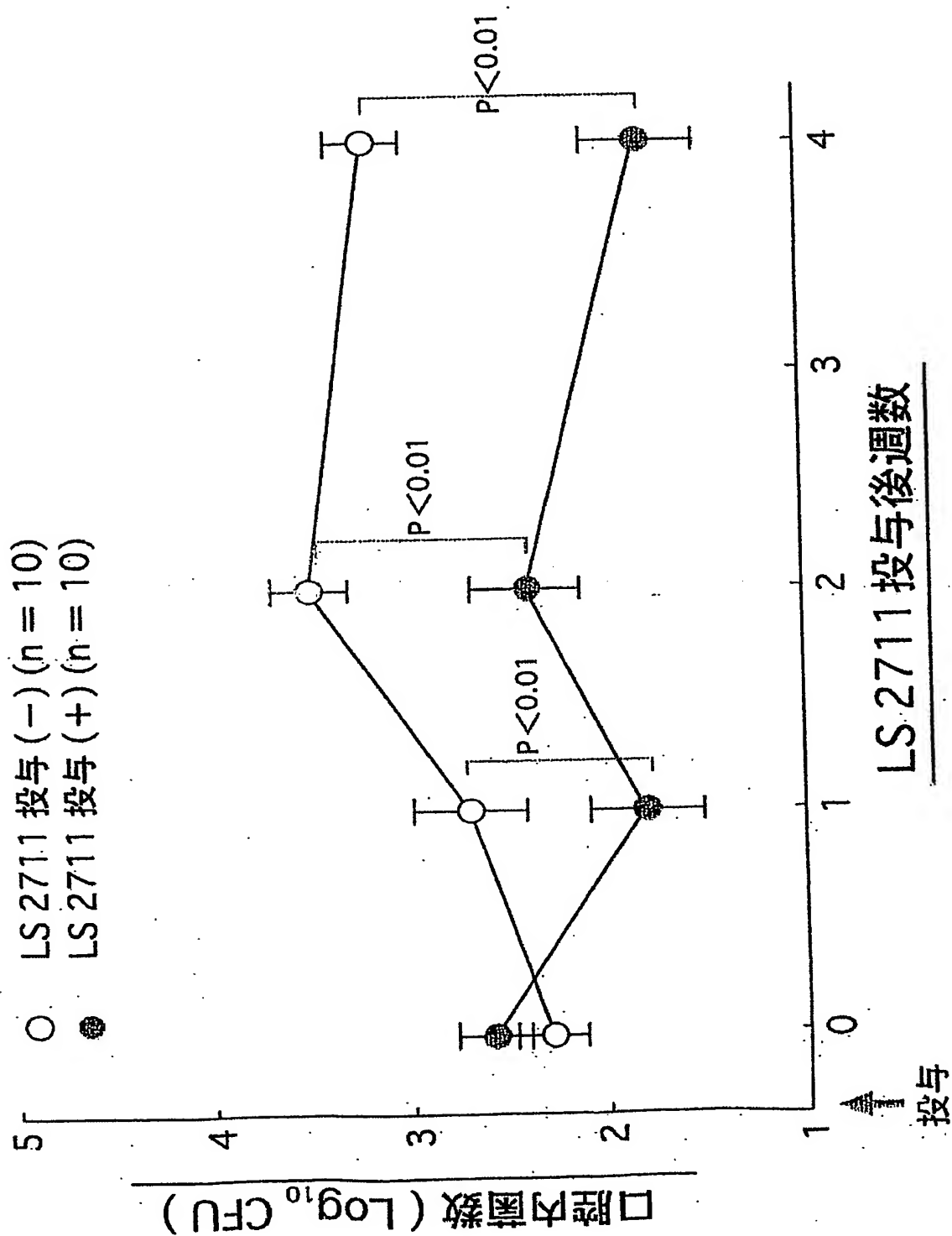
1/11

図 1



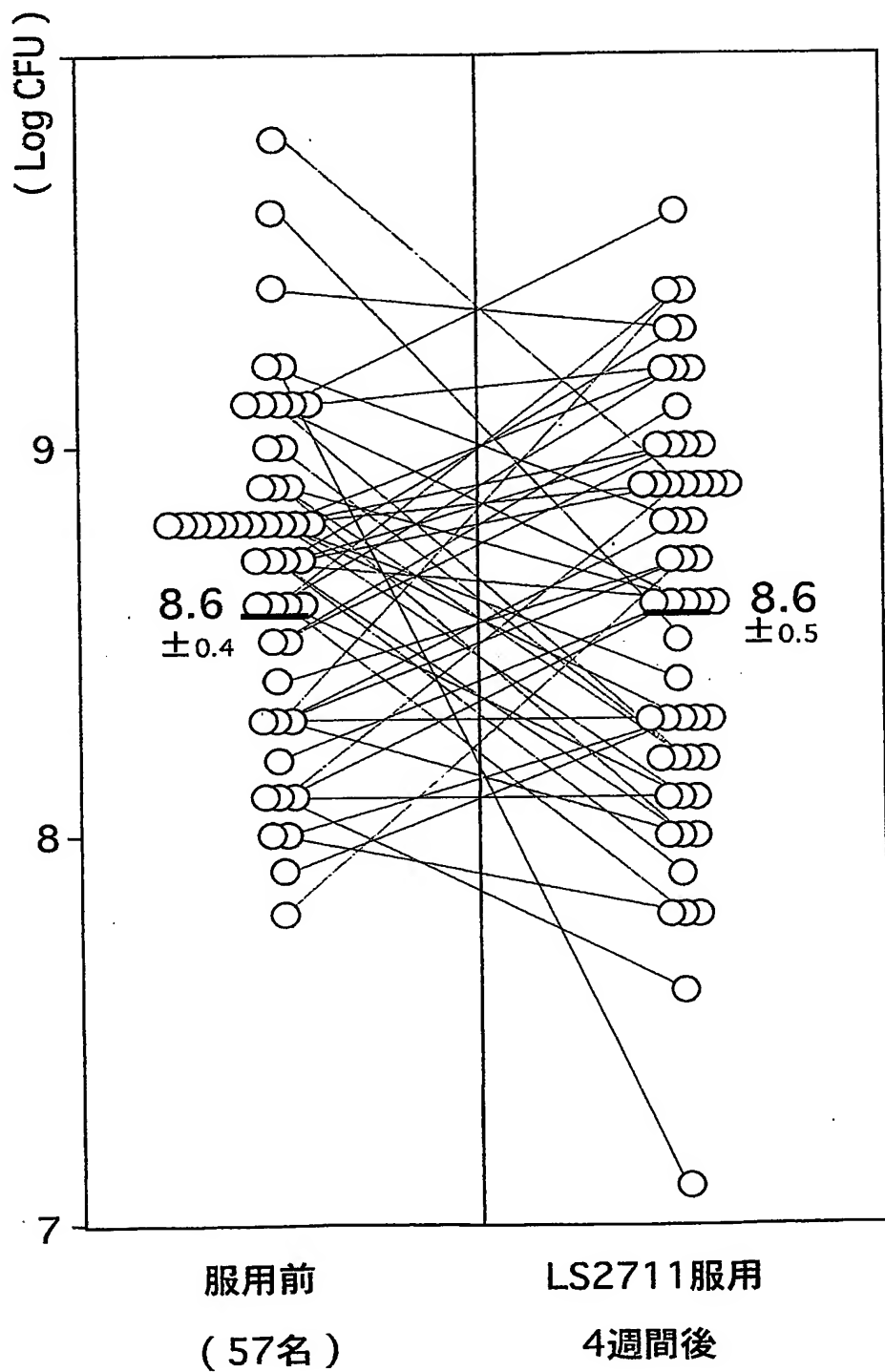
2/11

図 2



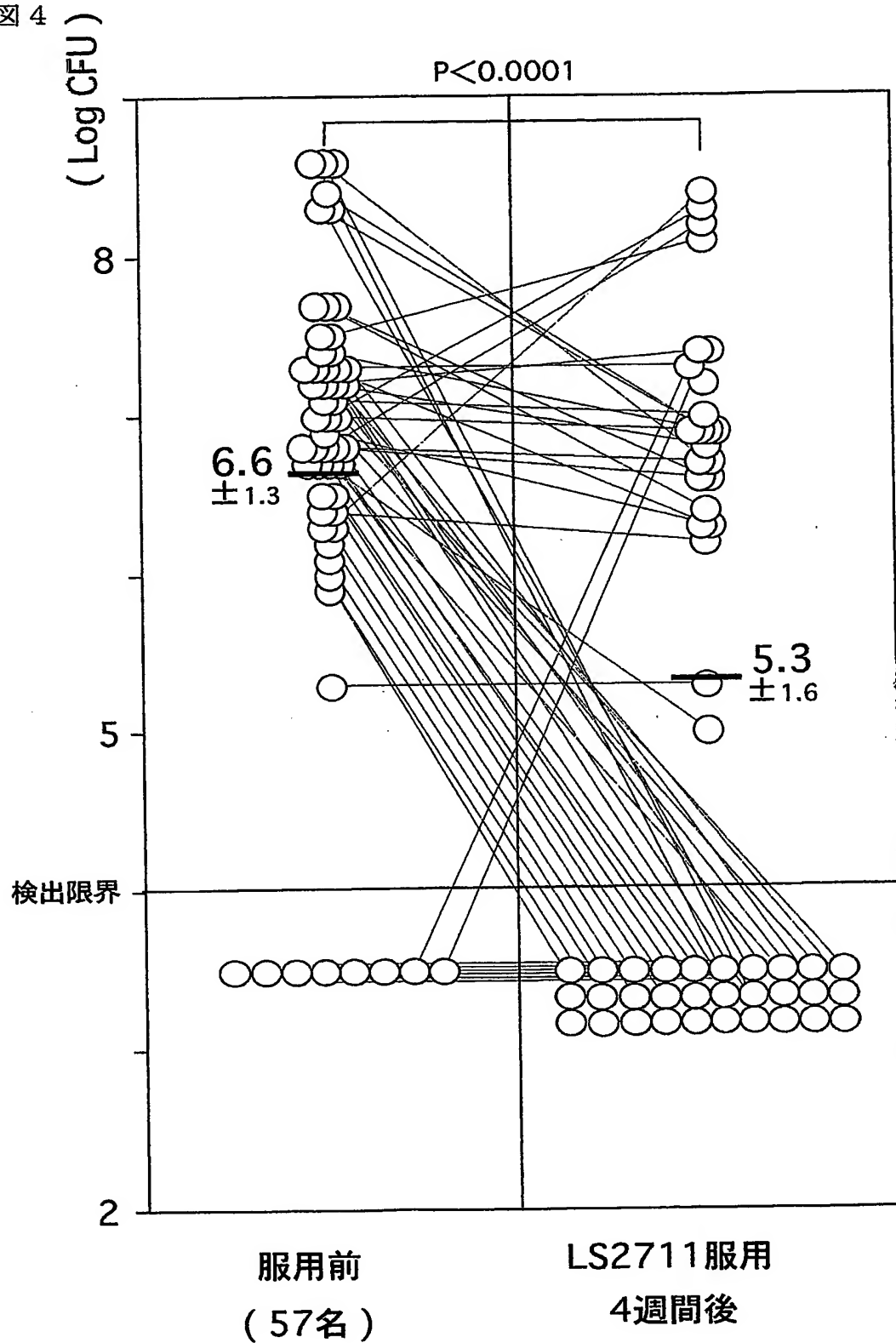
3/11

図 3



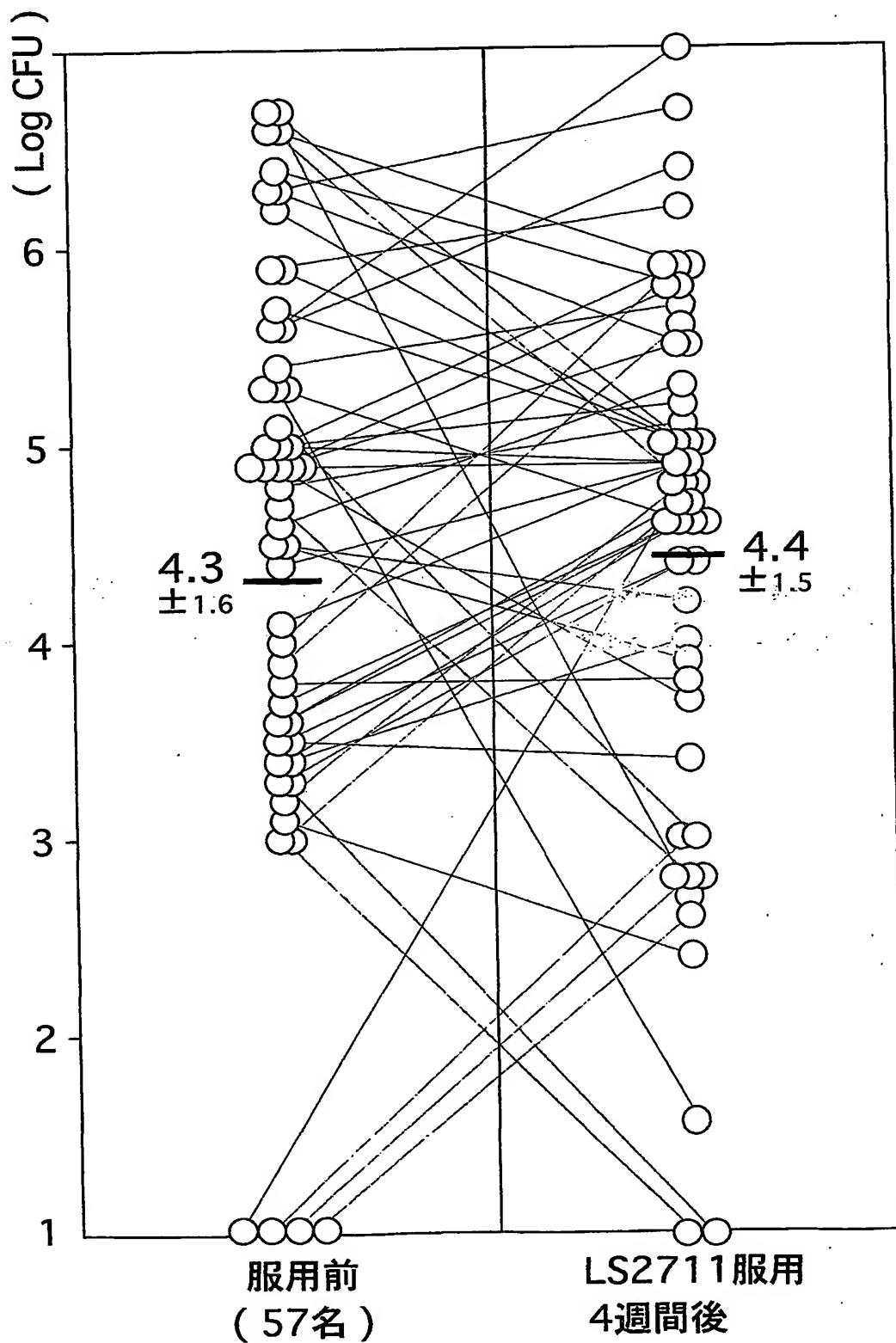
4/11

図 4



5/11

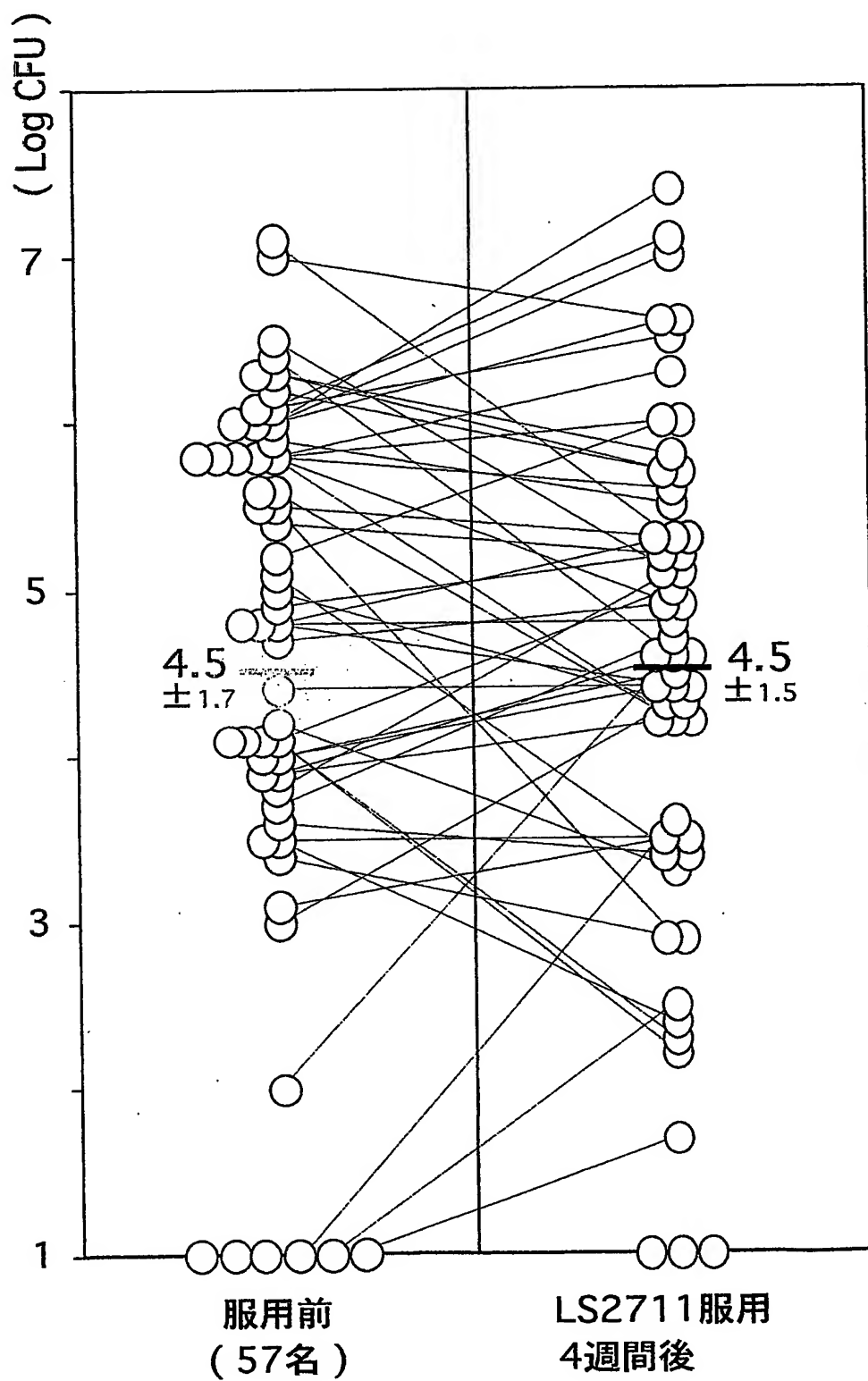
図5



差替え用紙(規則26)

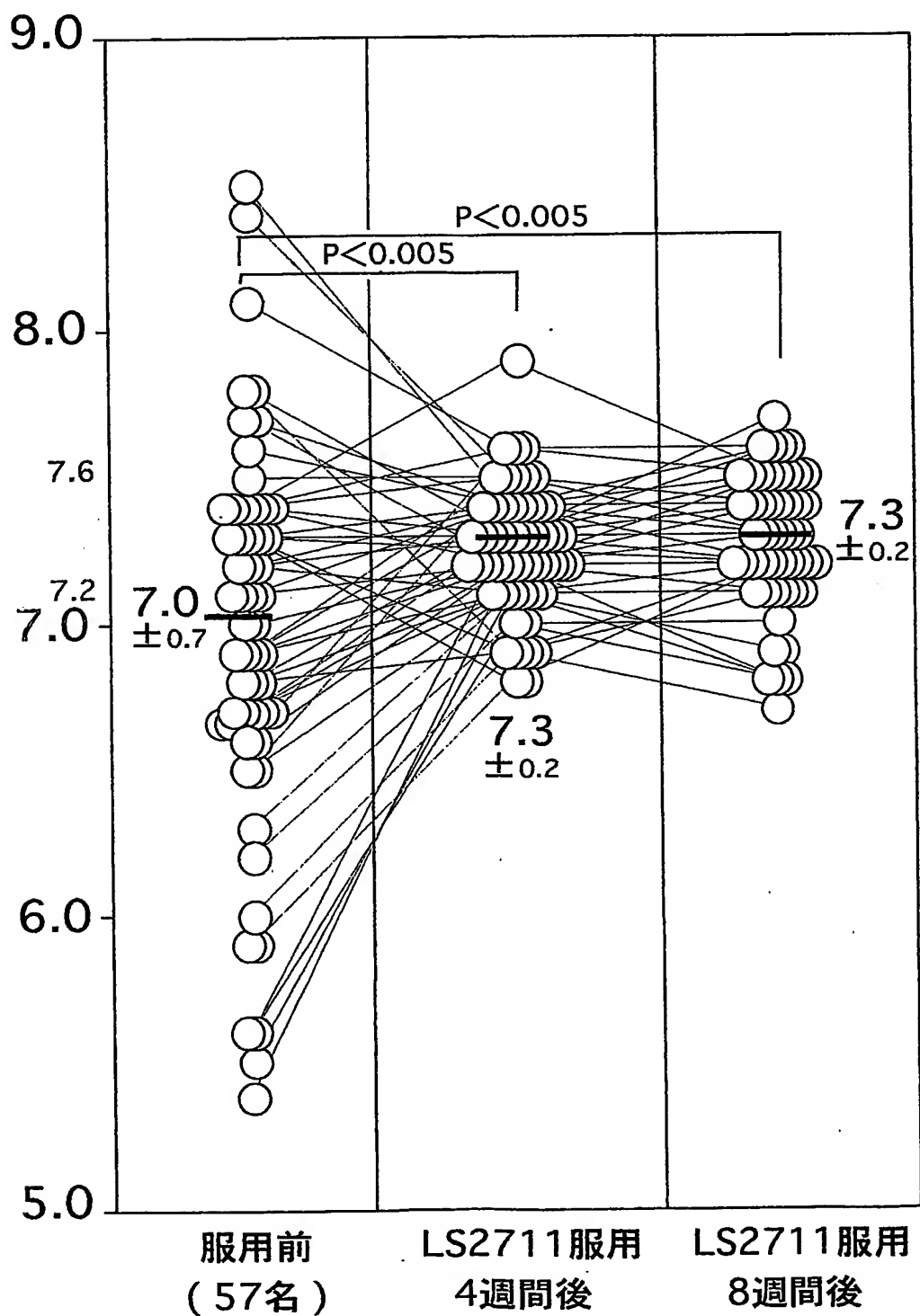
6/11

図 6



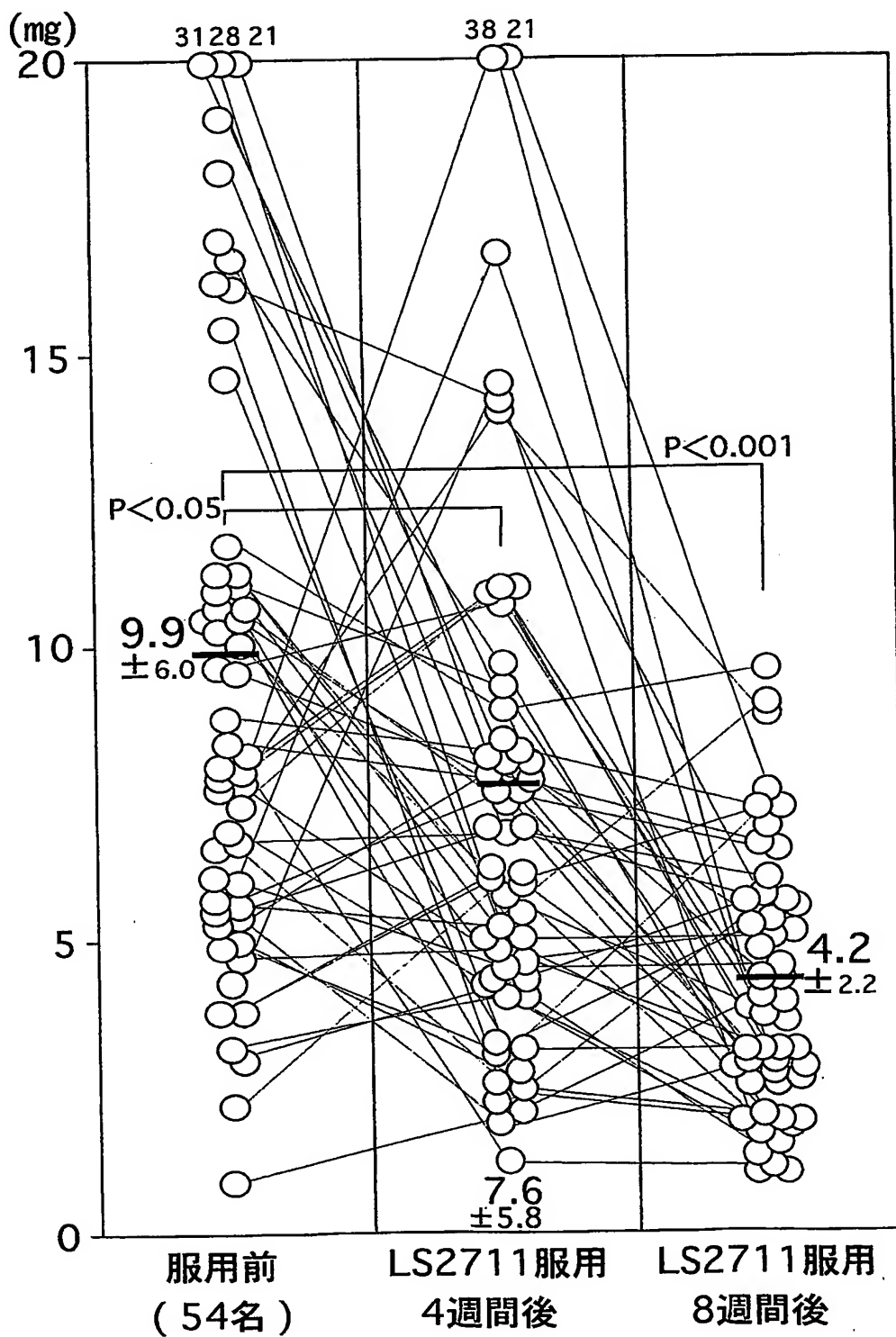
7/11

図 7



8/11

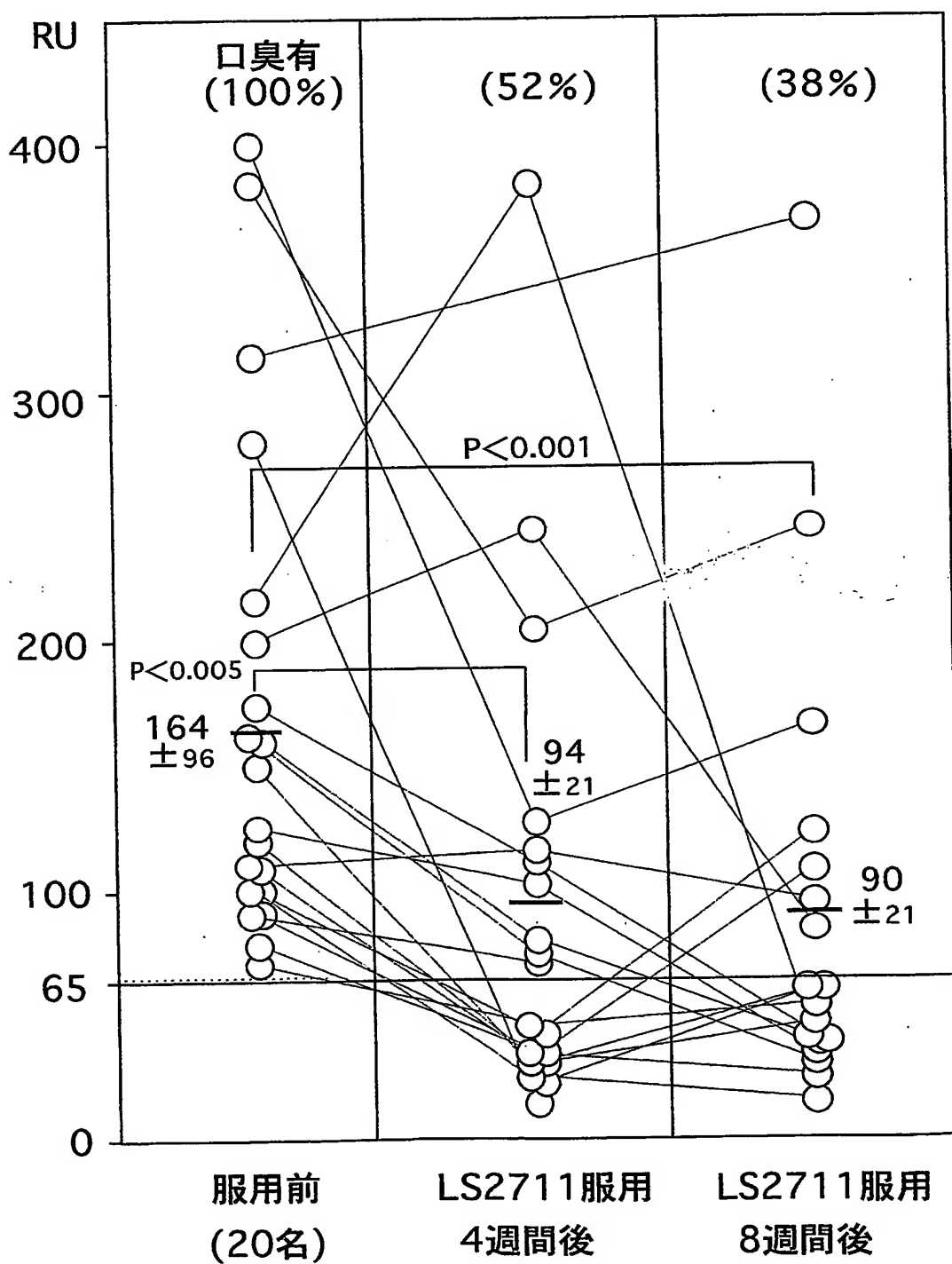
図 8



差替え用紙 (規則26)

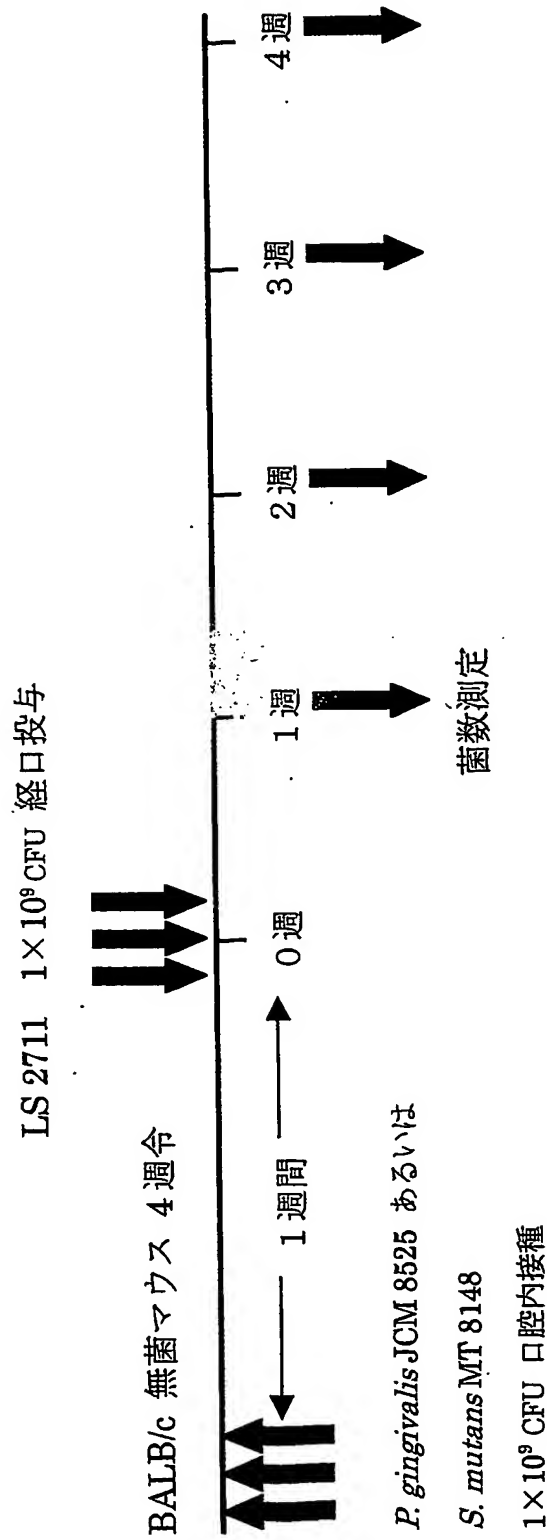
9/11

図 9



10/11

図 10

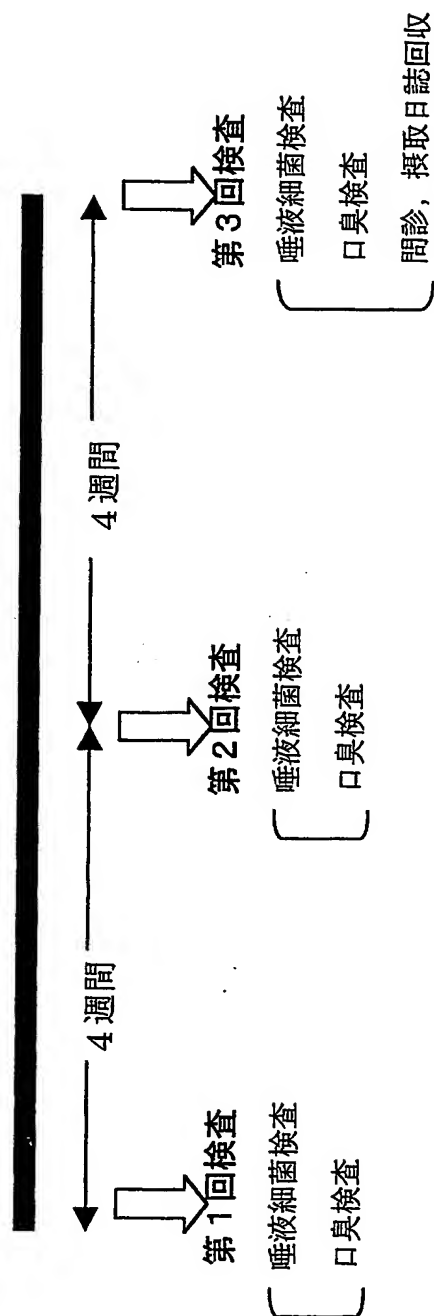


11/11

図 11

ラクトバシルス・サリバリウス乳酸菌による歯周病菌
および虫歯菌抑制に関する臨床試験プロトコール

乳酸菌 LS 2711 を含む錠菓を服用 (1 回 5 粒、1 日 5 回)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03177

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A23L1/28, C12N1/14, A61K35/74, A61P1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A23L1/28-A23L1/30, C12N1/14, A61K35/74, A61P1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	EP 154549 A2 (Advance Kaihatsu Kenkyusho Kabushiki Kaisha), 11 September, 1985 (11.09.85), & JP 61-91126 A	<u>1-4</u> 5-12
<u>X</u> A	WO 01/10233 A1 (Yakult Honsha Co., Ltd.), 15 February, 2001 (15.02.01), & JP 2001-190272 A	<u>1-4</u> 5-12
A	JP 10-7577 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 13 January, 1998 (13.01.98), (Family: none)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 May, 2002 (15.05.02)Date of mailing of the international search report
04 June, 2002 (04.06.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A23L1/28, C12N1/14, A61K35/74, A61P1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A23L1/28~A23L1/30, C12N1/14, A61K35/74, A61P1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (JOIS), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	EP 154549 A2 (株式会社アドバンス開発研究所) 1985. 09. 11 & JP 61-91126 A	<u>1-4</u> 5-12
<u>X</u> A	WO 01/10233 A1 (株式会社ヤクルト本社) 2001. 02. & JP 2001-190272 A	<u>1-4</u> 5-12
A	JP 10-7577 A (株式会社ヤクルト本社) 1998. 01. 13 (ファミリーなし)	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 05. 02

国際調査報告の発送日

04.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448